

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-58166

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)3月13日

G 01 N 30/88

C-7621-2G

21/76

8305-2G

33/82

8305-2G

// G 01 N 33/15

7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 混合ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法

⑯ 特 願 昭60-198734

⑰ 出 願 昭60(1985)9月9日

特許法第30条第1項適用 昭和60年3月10日 社団法人日本薬学会発行の「日本薬学会第105年会講演要旨集」に発表

⑱ 発 明 者 小 川 原 浩 成田市加良部4-22-2-504

⑲ 発 明 者 洞 口 靖 成田市飯田町202-124

⑳ 発 明 者 諸 井 政 己 船橋市高根台2-2-27-306

㉑ 発 明 者 西 村 征 男 佐倉市ユーカリが丘1-44-11

㉒ 出 願 人 エスエス製薬株式会社 東京都中央区日本橋浜町2丁目12番4号

㉓ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

## 明 細 書

## 〔産業上の利用分野〕

## 1. 発明の名称

本発明は混合ビタミン製剤中の水溶性ビタ

混合ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の同

ミン類の同時定量法に関する。

時定量法

なお、本明細書において、水溶性ビタミン

## 2. 特許請求の範囲

類とは、アスコルビン酸、塩酸チアミン、リ

## 1. 混合ビタミン製剤を、次の①～③、

ン酸リボフラビンナトリウム、塩酸ピリドキ

① 極性溶媒

シン、ニコチン酸アミド、パントテノール等

② リン酸緩衝液

のビタミンをいう。

③ イオン対試薬

〔従来の技術〕

よりなる移動相を用いたイオン対クロマトグ

従来、混合ビタミン製剤中のビタミン類の

ラフに付し、次いで溶離液を発光試薬とし

定量は、個々のビタミンごとに比色法、UV

てオルトフタルアルデヒドを用いた発光法

法、滴定法、微生物学的定量法等の手分析で

で分析することを特徴とする混合ビタミン製

行なわれ、多くの労力と時間を必要とする作

剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法。

業であつた。

## 3. 発明の詳細な説明

ところが、最近の高速液体クロマトグラフ

法の技術上の進歩と相俟つて、ここ数年以内に高速液体クロマトグラフ法による水溶性ビタミン類の同時定量法が数多く報告されてた〔ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・サイエンス (Journal of Pharmaceutical Science) 70, 1014~1017 (1981); 同、70, 90~101 (1981); 同、67, 1444~1446 (1978)〕。これらは充填剤にイオン交換樹脂を用いイオン交換作用によつて分離する方法と非極性充填剤を用いた逆相クロマトグラフ法に大別できる。

而して、近年では後者の逆相クロマトグラフ法、就中、移動相に適当な対立イオンを加えイオン対を形成させ、非極性固定相により分離するイオン対クロマトグラフ法が主流と

斯かる実状において、本発明者らは鋭意研究の結果、上記水溶性ビタミン類の同時定量に最適な移動相を用いたイオン対クロマトグラフ法と、この移動相に関して至適なオルトフタルアルデヒド発蛍光によるパントテノール検出法を組み合わせることにより、上記の水溶性ビタミン類を一括同時に、しかも迅速かつ高精度に定量することができることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、混合ビタミン製剤を、次の①~③、

- ① 極性溶媒
- ② リン酸緩衝液
- ③ イオン対試薬

よりなる移動相を用いたイオン対クロマトグ

らつている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら、これらの同時定量法では、上記水溶性ビタミンの全てを同時定量することとはできない。すなわち、水溶性の医薬品に常用されているリン酸リボフラビンナトリウムを、由来の不純物、分解物及び塩酸チアミン、塩酸ピリドキシン、アスコルビン酸、ニコチン酸アミドから分離定量したという報告はない。また、パントテノールについては、そのUV吸収が波長200nm付近にあるだけで、それ以外で吸収が全くないために、他の水溶性ビタミン類との同時測定は困難であつた。

〔問題点を解決するための手段〕

ラフに付し、次いで溶離液を発蛍光試薬としてオルトフタルアルデヒドを用いた発蛍光法により分析することを特徴とする混合ビタミン製剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法を提供するものである。

以下、本発明方法を、これに使用される分析装置の一例を示す第1図と共に説明する。

分析装置は、Aで示されるイオン対クロマトグラフと、これに直列に接続されたBで示されるパントテノール検出システムよりなつている。イオン対クロマトグラフAは、1で示されるカラムと2で示されるUV検出器及び3で示される移動相等よりなるもので、通常のクロマトグラフと同様の構成を有する。また、パントテノール検出システムBは、発

発光試薬としてオルトフタルアルデヒドを用いた発光法(以下、OPA発光法という)

を行なうためのB-1で示されるOPA発光システムとB-2で示される発光検出器よりなっている。OPA発光システムB-1は、3つの反応管が直列に接続したもので、パントテノールをOPA発光法により検出するためのものである。

イオン対クロマトグラフAによるクロマト操作は常法に従って行なうことができる。カラム1としては、シリカゲル担体にオクタデシルシラン処理を施して得られるもの、例えばTSK-Gel ODS-120T〔東洋曹達工業製〕、 $\mu$ -ボンダパックC<sub>18</sub>(米国ウォーターズ社製)等が挙げられるが、就

ンスルホン酸ナトリウム、ヘキサンスルホン酸ナトリウム、ヘプタンスルホン酸ナトリウム等が挙げられるが、就中、ペンタンスルホン酸ナトリウムが特に好ましい。イオン対試薬は、移動相の全組成中に0.05~0.2w/v(%)となるように配合するのが好ましく、この範囲以外では良好な分離が得られない。なお、移動相は、通常1.0ml/分程度の流量で送液される。

またUV検出器2では、270~280nmの波長で検出を行なうのが好ましい。

斯くしてイオン対クロマトグラフ分析を行なうと、アスコルビン酸、ニコチン酸アミド、塩酸ピリドキシン、パントテノール、塩酸チアミン、リン酸リボフラビンナトリウムの順

中TSK-Gel ODS-120Tが好ましい。

移動相3としては、リン酸緩衝液、極性溶媒及びイオン対試薬よりなる溶液が使用される。極性溶媒としては、エタノール、メタノール等が挙げられるが、特にメタノールが好ましい。リン酸緩衝液は、水にリン酸一カリウムを添加し、リン酸によつてpHを調整したもので、リン酸一カリウム濃度が0.01~0.02M、pHが3.0~3.5のものが特に好ましい。リン酸緩衝液と極性溶媒の混合比率は、一般に80:20~90:10となるように調整するが、極性溶媒がメタノールの場合には84:16とするのが特に好ましい。また、イオン対試薬としては、例えばペンタ

で溶出される。しかし、パントテノールは、270~280nmにUV吸収がないためここでは検出できず、OPA発光法によるパントテノール検出システムBによつて初めて定量可能となる。

OPA発光システムB-1は、3つの反応管を有し、反応管aでは溶離液に一定濃度のアルカリ溶液を加え、加温してパントテノールを $\beta$ -アラニンに加水分解する。反応管bでは、加水分解後、酸を加えて中和を行なう。次いで、反応管cにおいて、前<sup>(理)</sup>処後の溶離液にオルトフタルアルデヒドを含有する発光試液を加えて発光物質を生成せしめた後、発光検出器B-2で定量する。

アルカリ溶液としては、水酸化ナトリウム

水溶液が好ましく、濃度は1～2規定とし、0.1 ml/分程度の流量で加えるのが好ましい。また、酸は使用したアルカリ溶液と同濃度にして同じ流量で添加する。加水分解温度は80～90℃が好ましく、これ以上では例えば移動相の極性溶媒としてメタノールを用いた場合、気泡が発生し分析精度が低下してしまふ。発光試液としては、0.05% オルトフタルアルデヒドを含む pH 9.0 ホウ酸緩衝液が好ましく、反応温度は50℃程度が好ましい。発光検出は、励起波長345 nm、検出波長455 nmで行なうのが好適である。なお、発光試液は、通常1.0 ml/分程度の流量で送液される。

## 〔作用〕

実施しなければならなかつた。従つて、本発明方法によれば、操作時間は1時間以内、精度面においても98%以上の信頼率で定量分析を行なうことが可能であり、本発明は製剤分析において非常に有効なものである。

## 〔実施例〕

次に実施例を挙げて説明する。

## 実施例1

下記方法により輸液用混合ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の定量を行なつた。

## (1) 操作法

アスコルビン酸100mg、ニコチン酸アミド20mg、塩酸ピリドキシン3mg、塩酸チアミン10mg、リン酸リボフラビンナトリウム2mg、パントテール5mgに対応する試料(本

本発明に使用される移動相は、水溶性ビタミン類及びそれら由来の不純物、分解物を良好に分離する。また、オルトフタルアルデヒドは、この分離液において発光物質への誘導体化を行なうことができる。

## 〔発明の効果〕

本発明は叙上の如き方法であるため、一回の分析で製剤中の塩酸チアミン、リン酸リボフラビンナトリウム、アスコルビン酸、塩酸ピリドキシン、ニコチン酸アミド、及びパントテール等の水溶性ビタミン類を定量することが可能である。従来の高速液体クロマトグラフ法の技術では、これらの中で同時に定量可能なものは3成分程度が限界であり、他の成分は個々に発光法、滴定法、比色法等で

品1ml)を正確に量り、移動相を加えて正確に100mlとし(以下、標準溶液という)、次の条件で液体クロマトグラフに付し、上記6成分を同時定量する。

輸液用混合ビタミン剤についても同様に操作を行ない、標準溶液の結果と比較する。

## (2) 分離条件

カラム条件: TSK-Gel ODS-120T

カラム管: 内径4mm 長さ25cm

移動相: 0.01Mリン酸-カリウム溶液

(pH 3.5)・メタノール(250

: 50) + 0.1% 1-ペンタ

ンスルホン酸ナトリウム

溶出速度: 1.0 ml/分

検出波長: UV 277 nm

カラム温度：室温

注 入 量：20  $\mu$ l

(3) 使用装置

島津 LC-3A 型高速液体クロマトグラフ

(4) パントテノール検出条件

① 加水分解

アルカリ溶液：2N-水酸化ナトリウム

流 量：0.1 ml/分

反応温度：90℃

② 中和

酸：2N-塩酸

流 量：0.1 ml/分

反応温度：室温

③ 発光反応

発光試液：0.05% OPA、0.2% 2-メ

パントテノール 25  $\mu$ g

アスコルビン酸 500  $\mu$ g

注射用蒸留水で5mlとする。

(6) 本発明方法により検出した各成分のピークは第1図の通りである。

実施例2

下記方法により内服用ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の定量を行なった。

(1) 操作法

ニコチン酸アミド15 $\mu$ g、塩酸チアミン10 $\mu$ g、リン酸リボフラビンナトリウム2 $\mu$ g、パントテニルアルコール30 $\mu$ gに対応する試料(本品20ml)を正確に量り、移動相を加えて正確に100mlとし(以下、標準溶液という)、次の条件で液体クロマトグラフに付し、

ルカプトエタノール、10%エ

タノールを含むpH 9.0 ホウ酸

緩衝液

流 量：1.0 ml/分

反応温度：50℃

(5) 試料(注射剤)

使用した試料は次の処方である。

(処方)

ビタミンA	10,000 IU
エルゴカルシフェロール	1,000 IU
酢酸トコフェロール	5 $\mu$ g
塩酸チアミン	50 $\mu$ g
リン酸リボフラビンナトリウム	10 $\mu$ g
塩酸ピリドキシン	15 $\mu$ g
ニコチン酸アミド	100 $\mu$ g

上記4成分を同時定量する。

(2) 分離条件

実施例1と同様。

(3) 使用装置

実施例1と同様。

(4) パントテノール検出条件

実施例1と同様。

(5) 試料(液剤)

使用した試料は次の処方である。

(処方)

桂枝湯流エキス	500 $\mu$ g
ニンジン流エキス	50 $\mu$ g
塩酸チアミン	10 $\mu$ g
リン酸リボフラビンナトリウム	2 $\mu$ g
メチルヘスペリジン	10 $\mu$ g

ニコチン酸アミド	15 mg
パントテノール	30 mg
シヤコウチンキ	0.05 ml
ゴオウチンキ	0.05 ml

精製水にて20 mlとする。

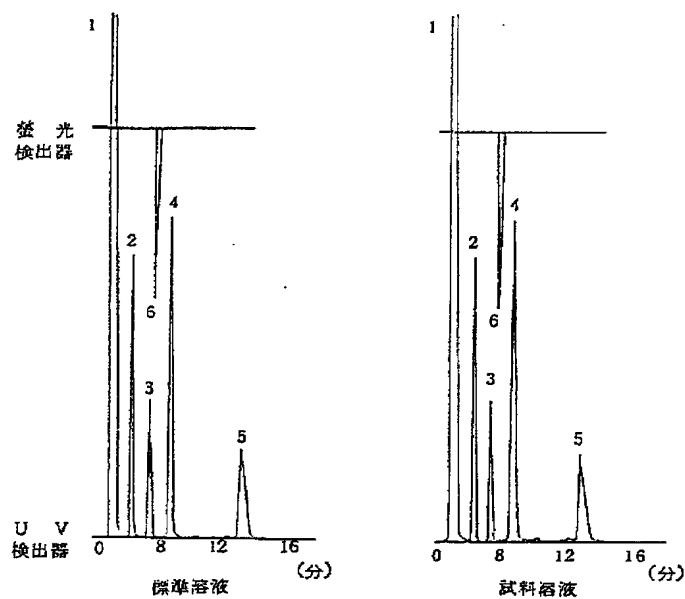
(5) 本発明方法により検出した各成分のピークは第2図の通りである。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は輸液用混合ビタミン剤を本発明方法で分析したときのクロマトグラム、第2図は内服用ビタミン剤を本発明方法で分析したときのクロマトグラム、第3図は本発明方法に使用される分析装置の一例を示す概略説明図である。

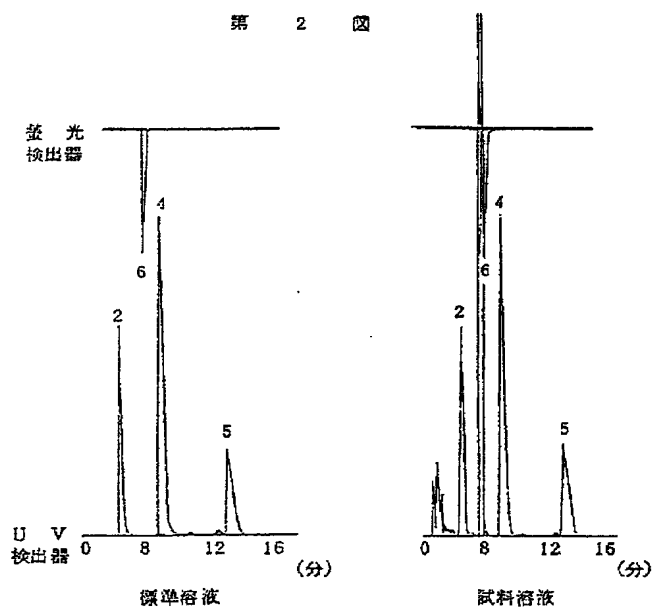
以上

第 1 図



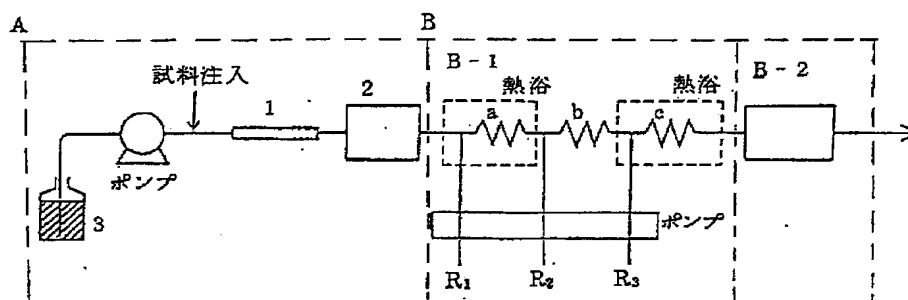
- |            |                  |
|------------|------------------|
| 1 アスコルビン酸  | 4 塩酸チアミン         |
| 2 ニコチン酸アミド | 5 リン酸リボフラビンナトリウム |
| 3 塩酸ピリドキシン | 6 パントテノール        |

第 2 図



- |                  |
|------------------|
| 2 ニコチン酸アミド       |
| 4 塩酸チアミン         |
| 5 リン酸リボフラビンナトリウム |
| 6 パントテノール        |

第 3 図



- A イオン対クロマトグラフ
- B ペントテノール検出システム
- B-1 OPA発蛍光システム
- B-2 蛍光検出器
- 1 カラム
- 2 UV検出器
- 3 移動相
- a、b、c 反応管
- R<sub>1</sub> アルカリ溶液
- R<sub>2</sub> 酸
- R<sub>3</sub> 発蛍光試験

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
【部門区分】第6部門第1区分  
【発行日】平成5年(1993)5月7日

【公開番号】特開昭62-58166  
【公開日】昭和62年(1987)3月13日  
【年通号数】公開特許公報62-582  
【出願番号】特願昭60-198734  
【国際特許分類第5版】

G01N	30/88	C 7621-2J
	21/76	7235-2J
	33/82	7055-2J
// G01N	33/15	7906-2J

手 続 補 正 書 (自発)

平成 4 年 4 月 6 日

特許庁長官 深 沢 亘 殿

6. 補 正 の 対 象

図 面

7. 補 正 の 内 容

(1) 第3図を別添の如く訂正する。

1. 事件の表示

昭和60年特許願第198734号

2. 発明の名称

混合ビタミン剤中の水溶性ビタミン類の同時定量法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 エスエス製薬株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)

共同ビル 電話(3669)0904内

氏 名 (6870) 弁理士 有 賀 三 幸

住 所 同 上

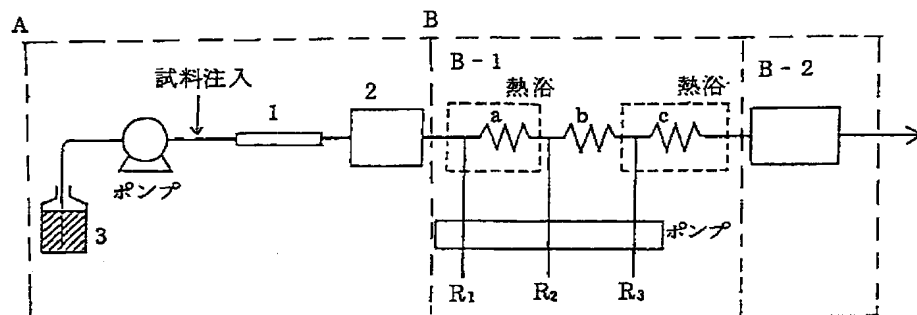
氏 名 (7756) 弁理士 高 野 登志雄

5. 補正命令の日付

日 発



## 第 3 図



- A    イオン対クロマトグラフ  
 B    ペントテノール検出システム  
 B-1   OPA発蛍光システム  
 B-2   蛍光検出器  
 1    カラム  
 2    UV検出器  
 3    移動相  
 a、b、c   反応管  
 R<sub>1</sub>   アルカリ溶液  
 R<sub>2</sub>   酸  
 R<sub>3</sub>   発蛍光試液

# METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTITATIVE ANALYSIS OF WATER-SOLUBLE VITAMINS IN MIXED VITAMIN PREPARATION

**Publication number:** JP62058166 (A)

**Also published as:**

**Publication date:** 1987-03-13

JP7001257 (B)

**Inventor(s):** OGAWARA HIROSHI; HORAGUCHI YASUSHI; MOROI MASAMI; NISHIMURA MASAO

JP1976418 (C)

**Applicant(s):** SS PHARMACEUTICAL CO

**Classification:**

- international: *G01N21/76; G01N21/78; G01N30/26; G01N30/74; G01N30/88; G01N33/15; G01N33/82; G01N21/76; G01N21/77; G01N30/00; G01N33/15; G01N33/82; (IPC1-7): G01N21/76; G01N30/88; G01N33/15; G01N33/82*

- European:

**Application number:** JP19850198734 19850909

**Priority number(s):** JP19850198734 19850909

## Abstract of JP 62058166 (A)

**PURPOSE:**To enable the quantification of water-soluble vitamins in a mixed vitamin preparation by one analysis, by subjecting the mixed vitamin preparation to an ion-pair chromatograph using a mobile phase consisting of a polar solvent, a phosphate buffer solution and an ion-pair reagent and subsequently analyzing the eluate by a fluorescent method using o-phthalaldehyde as a fluorescent reagent. **CONSTITUTION:**The simultaneous quantitative analysis of water-soluble vitamins in a mixed vitamin preparation can be rapidly performed with high accuracy by combining an ion-pair chromatograph method using a mobile phase consisting of a polar solvent, a phosphate buffer solution and an ion-pair reagent with a pantenol detection method according to an ortho-phthalaldehyde fluorescent method optimum to said mobile phase.; As the polar solvent, methanol is especially pref. and, as the phosphate buffer solution, one with a phosphate-potassium concn. of 0.01-0.02M and pH3-3.5 is especially pref. As the ion-pair reagent, sodium pentasulfonate is especially pref.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide